

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-47392

(43) 公開日 平成8年(1996)2月20日

(51) Int.Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所
C 1 2 N 15/09 Z N A
C 0 7 K 7/08 8318-4H
14/415 8318-4H
// A 6 1 K 39/36 A B F
9281-4B C 1 2 N 15/ 00 Z N A A
審査請求 未請求 請求項の数12 F D (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-297840

(22) 出願日 平成6年(1994)11月7日

(31) 優先権主張番号 特願平5-276773

(32) 優先日 平5(1993)11月5日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(31) 優先権主張番号 特願平6-134868

(32) 優先日 平6(1994)5月26日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000006138

明治乳業株式会社

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(72) 発明者 曾根 敏雄

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(72) 発明者 小宮山 直樹

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社ヘルスサイエンス研究所内

(72) 発明者 紀 光助

神奈川県小田原市成田540番地 明治乳業
株式会社ヘルスサイエンス研究所内

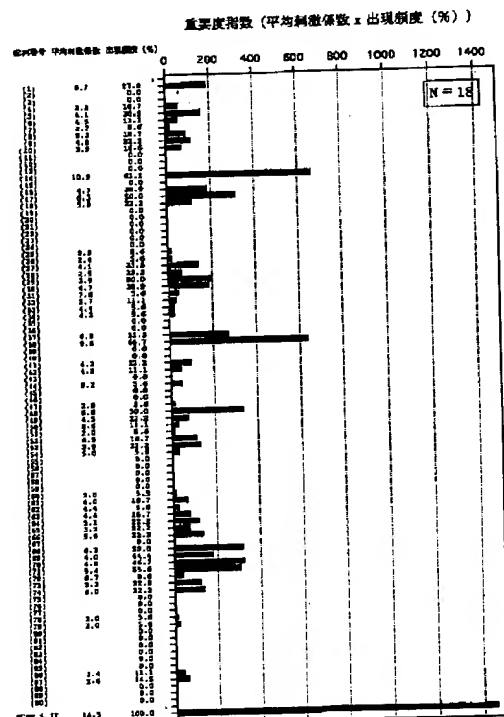
(74) 代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

(54) 【発明の名称】 スギ花粉アレルゲンCry j II エピトープ

(57) 【要約】

【目的】 スギ花粉症の診断、予防および治療に有用なスギ花粉アレルゲンCry j IIの少なくとも一つのエピトープ、特にT細胞エピトープを含むタンパク質またはペプチドを提供する。

【構成】 スギ花粉アレルゲンCry j IIをコードするcDNAをクローニングし、Cry j IIの全アミノ酸配列を明らかにした。更に、該アミノ酸配列全長にわたってオーバーラップペプチドを合成し、スギ花粉症患者由来のCry j II T細胞ラインを用いて、T細胞エピトープを含むオーバーラップペプチドを同定した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表1記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、少なくとも1つのエピトープを保持するタンパク質またはペプチド。

【請求項2】 請求項1記載のタンパク質またはペプチドをコードするDNA。

【請求項3】 配列表3記載の塩基配列の全部または一部を含むことを特徴とする、請求項2記載のDNA。

【請求項4】 配列表2記載のアミノ酸配列の全部または一部を含み、少なくとも1つのエピトープを保持するタンパク質またはペプチド。

【請求項5】 請求項4記載のタンパク質またはペプチドをコードするDNA。

【請求項6】 配列表4記載の塩基配列の全部または一部を含むことを特徴とする、請求項5記載のDNA。

【請求項7】 T細胞エピトープであることを特徴とする、請求項1または4記載のタンパク質またはペプチド。

【請求項8】 下記のそれぞれのアミノ酸配列の全部または一部を含むことを特徴とする、請求項7記載のタンパク質またはペプチド。

1. Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly Asp
4. Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala
5. Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro
6. Thr Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu
7. Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser Lys
8. Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn
9. Val Pro Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn
10. Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys Gln Pro
14. Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys
16. Pro Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys
17. Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr
18. Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly
25. Glu Ile Cys Asn Asp Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp
26. Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu
27. Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ile

e Gln Gly Leu

28. Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser
29. Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu
30. Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu Val Phe Gly Asn Cys
31. Pro Glu Phe His Leu Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile
32. Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile
33. Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile Thr Ala Pro Arg Asp
34. Ile Gly Ile Ser Ile Thr Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp
37. Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn
38. Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly
41. Asp Asp Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile
42. Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu Ile Cys
44. Glu Asp Leu Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser
47. Leu Gly Arg Glu Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val
48. Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe
49. Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln Asn
50. Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr
51. Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly
52. Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser
53. Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu
54. Ser Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile
60. Ala Ser Ala Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp
61. Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn
62. Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly Thr Ser
63. Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala
64. Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Glu

n Leu Lys Cys

65. Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met Pro

66. Ile Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile Lys

68. Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser

69. Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser

70. Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn

71. Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe

72. Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile

73. Ala Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn

74. Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro Ser Ala

78. Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val Met Val Gly Asn Met Arg

79. Pro Lys Thr Val Met Val Glu Asn Met Arg Ala Tyr Asp Lys Gly

86. Cys Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met

87. Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gly Glu Tyr Tyr

【請求項9】 下記のそれぞれのアミノ酸配列の全部または一部を含むことを特徴とする、請求項7記載のタンパク質またはペプチド。

14. Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys

17. Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr

29. Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Gly Phe His Leu

38. Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly

48. Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe

68. Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser

70. Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn

71. Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe

【請求項10】 請求項8または9に記載のタンパク質またはペプチドをコードするDNA。

【請求項11】 請求項8または9に記載のタンパク質またはペプチドと免疫学的に交差反応性を有するタンパ

ク質またはペプチド。

【請求項12】 請求項11に記載のタンパク質またはペプチドをコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、スギ花粉症の診断、予防もしくは治療に有用な、スギ花粉アレルゲンCry j IIのエピトープ、特にT細胞エピトープを含むタンパク質またはペプチド、または該タンパク質またはペプチドをコードするDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】スギ花粉症は、スギ花粉が飛散する春先にほぼ全国的に観察されるアレルギー性疾患であり、くしゃみや鼻汁、目のかゆみ等を伴うアレルギー症状を呈する。その患者数は、1970年以降急激に増加しており、現在全国民の10%弱に当たる約一千万人がスギ花粉症に苦しめられている。

【0003】アレルギー性疾患を形成するアレルギー反応は、R. G. H. Gell とR. R. A. Coombs によりI型～IV型の4種に分類されており、スギ花粉症はI型に属する。I型アレルギーの発症機序は以下の通りである。

【0004】アレルギー反応を引き起こす分子をアレルゲン（本明細書では抗原ともいう）というが、花粉の場合このアレルゲンがタンパク質抗原である。これらの外来タンパク質抗原が体内に侵入すると、抗原提示細胞（マクロファージ）に取込まれ、タンパク質分解酵素によって分解されてペプチド断片になり、主要組織適合抗原複合体（Major Histocompatibility Complex: MHC）クラスII分子（ヒトではHLAクラスII分子）と結合した状態で、細胞膜上に提示される。HLAクラスII分子は多型性を示すが、CD4⁺T細胞のレセプターは、HLAクラスII分子と結合した抗原ペプチドを、そのHLAクラスII分子の多型性を示す部分と共に認識し、抗原特異的に活性化される。活性化されたCD4⁺T細胞は、Th0細胞、Th1/Th2細胞に分化し、種々のサイトカインを産生する。その際、それぞれの細胞のサイトカイン産生パターンは異なっており、Th1はIL-2、IFN γ を、Th2はIL-4、IL-5、IL-10等を、Th0は両者のサイトカインを産生する。

【0005】一方、B細胞は細胞表面にIgMあるいはIgDを表現しており、抗原を細胞内に取込むことによって活性化される。その際、Th2から産生されるサイトカインの作用によって、活性化されたB細胞は抗体産生細胞にまで分化増殖し、抗原特異的な免疫グロブリンE（IgE）を産生する。このようにして産生されたIgEは、気道あるいは鼻粘膜組織中のマスト（肥満）細胞や血液中の好塩基球にIgEレセプターを介して強固に結合し、感作が成立した状態になる。

【0006】再び、アレルゲンが体内に侵入すると、1分子のアレルゲンは、直ちにマスト細胞や好塩基球上の

2 分子以上のIgE と結合し、架橋構造を形成する。その結果、IgE 分子と結合しているレセプター同士が会合し、これが引き金となって、細胞膜内の幾種類もの酵素が活性化され、ヒスタミンやプロスタグランジン、ロイコトリエンといった種々の化学伝達物質が細胞から放出される。これらの化学伝達物質が鼻粘膜や気道などの局所に作用して、色々なアレルギー症状を引き起こす。

【0007】なお、T 細胞によって認識されるエピトープをT 細胞エピトープ、B 細胞によって認識されるエピトープをB 細胞エピトープという。

【0008】アレルゲンのエピトープは、I 型アレルギーの発症及び増悪に直接関与していると考えられるので、アレルゲンのエピトープを同定することは、I 型アレルギーの診断、予防及び治療に有用である。

【0009】スギ花粉の主要アレルゲンは、安枝らによって単離精製され、Sugi Basic Protein (SBP) と命名された (Yasueda, H., et al., J. Allergy Clin. Immunol. 71, 77-86, 1983)。このSBP は、分子量が45~50kDa で、WHO の命名法に従い現在Cry j I と呼ばれている。更にその後、Cry j I の分離精製の過程で、Cry j I とは抗原性の異なる、分子量が37kDa のCry j IIが分離された (Tanai, M. et al. FEBS Letters 239, 329-332, 1988, Sakaguchi, M. et al. Allergy 45, 309-312, 1990)。

【0010】これらの結果、Cry j I とCry j IIとは全く異なるタンパクであることが明らかとなったが、スギ花粉症患者では、Cry j I とCry j IIの両者が反応していることが報告された。すなわち、145 名のスギ花粉症患者血清中、134 名 (92.4%) の血清がCry j I 及びCry j IIと反応し、6 名 (4.1%) の血清がCry j I とのみに反応し、5 名 (3.4%) の血清がCry j IIとのみ反応することが判明した (1993年第43回日本アレルギー学会、橋本ら、日獣大、予研、国立相模原病院、林原生化研)。つまり、スギ花粉症の発症には、Cry j I 及びCry j IIのどちらも重要であることが示された。

【0011】Cry j I については、それをコードするcDNAがクローニングされ、その推定アミノ酸配列に基づき、T 細胞エピトープを含むペプチドが同定されている (W094/01560, "ALLERGENIC PROTEINS AND PEPTIDES FROM JAPANESE CEDAR POLLEN")。Cry j IIについては、N 末端のアミノ酸配列のAla、Ile、Asn、Ile、Phe、Asn、Val、Glu、Lys 及びTyr の10アミノ酸残基が報告されている (Sakaguchi, M., et al., Allergy 45, 309-312, 1990) に過ぎない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、スギ花粉症の診断、予防及び治療に有用な、スギ花粉アレルゲンCry j IIの少なくとも1つのエピトープ、特にT 細胞エピトープを含むタンパク質またはペプチド、または該タンパク質またはペプチドをコードするDNAを提供するこ

とを目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、上記課題を解決するために、

(1)Cry j II の全アミノ酸配列 (一次構造) の解明

(2)Cry j II の全アミノ酸配列をカバーするオーバーラップペプチドの作製

(3)Cry j II アレルゲンを特異的に認識するT 細胞ライオンを個人別に樹立

10 (4) 抗原提示細胞 (B 細胞株) の樹立

(5)T細胞エピトープを含むオーバーラップペプチドの同定

を行い、本発明を完成した。なお、本発明でいうエピトープは、T 細胞エピトープに限られるものではないが、以下T 細胞エピトープについて詳述する。これらの各ステップを以下に説明する。

【0014】(1)Cry j II の全アミノ酸配列の解明

① cDNAのクローニング

a. RNAの抽出

20 RNAを抽出する際、通常、初期段階で蛋白質を除去する。このため一般的な方法として、フェノール抽出方法、グアニジウム塩、界面活性剤、尿素などの蛋白質変性剤などを用いる方法がある。

【0015】スギ花粉からのRNA 抽出は、Breitenederら (Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 87: 19-24, 1988) の方法に改良を加えて行うことができる。

【0016】スギ花粉を、10~20倍量の抽出緩衝液 (10mM LiCl、10mMNa₂ EDTA、1%SDS、20%メルカプトエタノール、100mM Tris-HCl pH 9.0) に懸濁し、これ 30 に等量のフェノールとクロロホルムの混液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=24:24:1) を加えホモジェナイズする。次いで遠心 (10,000g、10~15分) し、フェノール・クロロホルム層と、水層の二層に分離する。このとき変性した蛋白質はフェノール・クロロホルム層に、核酸は水層に移行する。水層にフェノール・クロロホルム混液を加え、振盪し水層に残存している蛋白質などの不純物をフェノール・クロロホルム層に移行させ除去する。このような操作を2回繰返す。

40 【0017】得られた水層からRNA を抽出するには、高濃度のLiCl (2~4M) またはCH₃COONa (3M) が存在するとDNA 及び蛋白質は上清に残り、tRNA以外のRNA は沈殿する性質を利用する。水層に同量の2~4MのLiClを添加し、RNA を沈殿させる。次いでこの水層を水に溶解し、0.1~0.3 容の冷エタノール (-20℃) を加え、RNA を沈殿させる (エタノール沈殿)。次いで遠心 (10,000g、30分) して沈殿を回収し、水に溶解して全RNA 分画を得る。

【0018】b. mRNA の調製とcDNAの合成

50 Cry j IIのmRNAは、3'末端にポリ(A) 鎖を持つので、こ

れと相補するリガンドとして12~18塩基のデオキシチミジン(dT)を結合したオリゴdTセルロースカラム(Clontech Laboratories Inc. 社製、CA、USA)にmRNAを吸着される。スギ花粉RNAに緩衝液(3M NaCl、1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH7.4)を加えてmRNAをカラムに吸着させる。mRNAは、ベッド体積の2~3倍量のNaClを含まない緩衝液(1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH7.4)で溶出する。

【0019】得られたmRNAからのcDNAライブラリーの作製は、現在市販されているファージベクターに用いたcDNAライブラリー作製キット(Amersham International plc.社製、Buckinghamshare、England)を用いて行うことが出来る。

【0020】c. Cry j II cDNAのスクリーニング

Cry j IIのN末端アミノ酸10残基が既に判明しているが、このアミノ酸配列から推定した塩基配列を持つ合成DNAをプローブとして、Cry j II cDNAをスクリーニングすることができる。プローブに用いるDNAを合成する場合、可能性のあるコドンを含むオリゴヌクレオチドを全て合成するよりも、可能性のある複数のコドン配列に対してハイブリダイズするようなオリゴヌクレオチドを設計することが望ましい。この合成オリゴヌクレオチドプローブの5'末端を[γ - 32 P]ATPとポリヌクレオチドキナーゼによって標識し、ブランクハイブリダイゼーション法により、前記cDNAライブラリーから陽性クローンをスクリーニングする。

【0021】得られた陽性クローンよりファージDNAを調製し、挿入cDNA断片を分離し、pUC18等のプラスミドにサブクローンする。必要に応じてオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、Sanger法等により塩基配列を決定し、クローンを同定する。本発明者らが単離したCry j II cDNAの全長の塩基配列を、配列番号5に示す。

【0022】Cry j IIをコードするcDNAは、全体で1733bpからなり、翻訳開始と想定されるコドン(45~47位のヌクレオチドATG)から終止コドン(1587~1589位のヌクレオチドTAA)に至るオープンリーディングフレームを含み、514アミノ酸をコードしている。オープンリーディングフレーム部分の塩基配列を配列番号3に示し、また該塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号1に示す。配列番号3で示される塩基配列には、個体間での対立遺伝子変異による多型性(polymorphism)及びその結果としてのアミノ酸配列の変異が考えられるがそのような変異を有するCry j IIの塩基配列及びアミノ酸配列も本発明に包含される。207~236位のDNA配列のコードするアミノ酸配列はAla、Ile、Asn、Ile、Phe、Asn、Val、Glu、Lys、Tyrであり、成熟型Cry j IIのN末端アミノ酸配列(Sakaguchi, M., et al., Allergy 45, 309-312, 1990)と一致する。N末端の54アミノ酸は、他のシグナルペプチドに見られる疎水性アミノ酸に富み、また成熟型Cry j IIに含まれていないことからシグナルペプチドと考えられる。

【0023】207位から終止コドン1587~1589位までのDNA配列がコードするCry j IIは、N末端のAlaからC末端のProまで460個のアミノ酸残基からなり、成熟型Cry j IIと考えられる。該成熟型Cry j IIに対応する塩基配列を配列番号4に、該塩基配列にコードされるアミノ酸配列を配列番号2に示す。配列番号2に示すアミノ酸配列からなるCry j IIの理論上の分子量は50,444Daである。一方、天然の成熟型Cry j IIは、還元条件下のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)で45KDaの位置にそのバンドが現れる(Sakaguchi, M., et al., Allergy 45, 309-312, 1990)。このことから、Cry j IIのC末端はプロセッシングを受けているものと考えられる。また成熟Cry j IIのアミノ酸配列の中には、N-グリコシド結合の可能性のあるAsn-X-Ser/Thrが存在する。

【0024】Cry j IIをコードするDNAの全長またはその一部を含むDNAは、蛍光標識、放射性標識あるいは酵素標識等によって標識することにより、生化学検査または関連蛋白質若しくは類似の配列を含む蛋白質をコードするDNAのスクリーニング等のためのプローブ、プライマーとして使用できる。また発現ベクターに接続して、少なくとも1つのエピトープを含むタンパク質またはペプチドを発現させることもできる。

【0025】②組換えCry j II(rCry j II)の発現 rCry j IIまたは少なくとも一つのCry j IIのエピトープを含む組換えタンパク質またはペプチドは、それぞれをコードするcDNAを発現ベクターに組込み、大腸菌、昆虫細胞、酵母または哺乳動物に導入し、培養することにより得ることができる。しかし、大腸菌などの原核細胞を使う発現系は、適切な糖鎖の付加(glycosylation)が行われないために、rCry j IIの発現には酵母などの真核細胞を使用することが好ましい場合がある。

【0026】Cry j IIの幾つかの発現システムの例を以下に示す。

【0027】a. 大腸菌での発現

T7ファージのプロモーターとRNAポリメラーゼを用いる系(F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendonff, "Methods in Enzymology", ed. by D. D. V. Goeddel, vol. 185, p. 60, Academic Press, New York, 1990)は、極めて発現の成功率が高いので、本発明に好適に使用できる。この系は、T7ファージのポリメラーゼ遺伝子を持つ大腸菌宿主BL21(DE3)に、T7ファージプロモーターの下流のマルチクローニングサイトに目的の遺伝子を挿入した組換えプラスミドを導入して、IPTG存在下で、目的の遺伝子が発現させるシステムである。例えば発現ベクターとしてpGEMEX-1(Promega社)などが使用できる。

【0028】また、目的の蛋白質を、大量発現可能な蛋白質と融合させて発現させる系が市販されており、これらの系は精製にアフィニティークラムが使える、精製効率

がよく、本発明に好適に使用できる。例えば、融合蛋白質に β -ガラクトシダーゼを有する発現ベクターpUEX(Amersham)を用いると、rCry j II は β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質として得られ、アフィニティカラムで効率よく精製することが出来る。また、グルタチオンS-トランスフェラーゼを有するpGEX(Pharmacia)や、マルトース結合蛋白質を用いたpMAL(New England Biolabs, Beverly, MA)などは、その融合部位に血液凝固因子Xaの切断部位が導入されており、Cry j II を分離することができる。

【0029】b. 酵母での発現

酵母を宿主とする系は発現産物のグリコシレーションが可能であり、このことは糖蛋白質であるCry j II の発現に好都合である。例えば酵母による異種蛋白質の発現系としては、ピキア酵母を宿主として用いる方法が知られており(特開昭61-108383号公報、特開昭61-173781号公報、特開昭63-44899号公報、特開平1-128790号公報等)、本発明に好適に使用できる。その他の酵母による発現系については、D. Emr Scott, "Methods in Enzymology", ed. by D. V. Goeddel, vol. 185, p.231, Academic Press, New York (1990) に詳述されており、本発明で使用できる。

【0030】c. 昆虫細胞での発現

昆虫細胞中を宿主とする系は発現産物のグリコシレーションが可能である。バキュロウイルスを用いた外来遺伝子発現システムは市販されており(PharMingen, San Diego, CA, USA)、本発明に好適に使用できる。このシステムについては、Luckow, V. A. らのTrends in the Development of Baculovirus Expression Vector, Bio/Technology (1987年9月11日)に記載されている。

【0031】d. 哺乳動物細胞での発現

哺乳類プロモーター(例えばメタロチオネイン)、ウイルスプロモーター(例えばSV40初期プロモーター)等を持つ発現ベクターに組み込み、哺乳動物細胞に導入することにより高発現させることができる。

【0032】(2) オーバーラップペプチドの合成

花粉症患者のT細胞が認識するCry j II のT細胞エピートープを分子レベルで解明するために、配列番号2に記載のCry j II cDNA のコードするアミノ酸配列に基づき、N末端のAla からC末端のPro に至る全460 アミノ酸残基をカバーするオーバーラップペプチドを作製する。これらのオーバーラップペプチドは、市販されているペプチド自動合成装置により容易に合成することができる。これらのオーバーラップペプチドの中から、少なくとも一つのエピートープを含むペプチドを同定する。特に、T細胞エピートープを同定するためには、花粉症患者の末梢血リンパ球から、Cry j II を特異的に認識し増殖応答するT細胞ラインを樹立する必要がある。一般に、患者毎に反応するT細胞エピートープが異なるので、患者毎にT細胞ラインを樹立することが望ましい。

【0033】(3) T細胞ラインの樹立

Cry j II 抗原特異的なT細胞ラインを樹立するには、通常患者の末梢血リンパ球をCry j II 抗原の存在下、7日間程度培養して抗原刺激によりT細胞を活性化し、さらに、活性化T細胞を、抗原と抗原提示細胞と共に7日間培養することを数回繰り返して抗原刺激することにより、抗原特異的なT細胞ラインを作製することができる。しかしながら、T細胞が増殖因子のIL-2の存在下でよく増殖している場合は、抗原刺激は最初だけにすることが望ましい。T細胞ラインを数度抗原刺激すると、増殖率の高いT細胞が選択的に取れ、T細胞エピートープを含むペプチドを同定する場合において、エピートープによっては十分な増殖応答を示さない場合が生じる。

【0034】使用する抗原としては、原理的には天然型Cry j II 抗原が望ましいが、極微量しかスギ花粉から抽出できないことから、組換えCry j II (rCry j II) あるいはオーバーラップペプチドの混合物も好適に使用できる。rCry j II は、大腸菌で発現させ精製したものが利用できる。

【0035】(4) 抗原提示細胞(B細胞株)の樹立

抗原提示細胞としては、T細胞ラインと同一人の末梢血リンパ球を、マイトマイシンC処理あるいは放射線照射して増殖能力を失わせたものが望ましい。しかし、採血回数が多くなるため、Epstein-Barr virus (EBV) を自己のBリンパ球に感染させトランスフォーメーションを起こさせたものは、in vitroで増殖し続けリンパ芽球様細胞株(B細胞株)となるので、このB細胞株を抗原提示細胞として用いてもよい。B細胞株の樹立方法は既に確立されている[組織培養の技術第二版、187-191頁、日本組織学会編(1988.8.10)]。

【0036】(5) T細胞エピートープを含むオーバーラップペプチドの同定

それぞれの患者固有のT細胞ラインが認識する、T細胞エピートープを含むペプチドは以下のようにして同定される。ここで「認識する」という意味は、T細胞レセプターが抗原エピートープ(MHC分子を含めて)と特異的に結合し、その結果、T細胞が活性化されることを意味し、活性化の状態は、リンホカインの産生や、DNAの合成を[^3H]チミジンの取込み量を指標として測定することにより観察される。すなわち、T細胞ラインとマイトマイシンC処理した同一人のB細胞株とを、96穴平底プレートに播種し、オーバーラップペプチドと共に混合培養し、[^3H]チミジンの取込み量(cpm)を液体シンチレーションカウンターで測定する。その際、[^3H]チミジンの取込みは、個々の培養系で異なるため、例えば、個々のペプチドに対するT細胞ラインの[^3H]チミジン取込み量(cpm)を、抗原を添加していないコントロールの[^3H]チミジン取込み量(cpm)で除した数(stimulation index: SI)が2以上をT細胞エピートープを含むペプチドと同定する。同定されたT細胞エ

11

トープを含むペプチドは、図4に列挙されている。

【0037】このようにして得られた本発明のCry j IIの少なくとも一つのT細胞エпитープを含むペプチドについては以下のことが考えられる。HLAクラスII分子と結合して抗原提示されるペプチドの長さは、ペプチドの解析結果(Chicz, R. M. et al.: J. Exp. Med., 178: 27-47, 1993)から、およそ10~34のアミノ酸残基からなるものと考えられるので、本発明のT細胞エпитープを含むペプチドはこのような長さのペプチドも含まれる。また、本発明のペプチドにアミノ酸置換、欠失あるいは付加などの修飾を行い、これらの修飾ペプチドに対する患者毎のT細胞ラインの増殖応答を測定することによって、本発明のCry j IIの少なくとも一つのT細胞エпитープを含むペプチドと免疫学的に同機能を有する修飾ペプチドを容易に作製することは、当業者が容易に実施しうることであり、これらの修飾ペプチドも本発明に包含される。

【0038】現在、減感作療法で使用されている減感作剤はスギ花粉から抽出された粗抗原であり、多量の多糖類を含んでいる。ロット差がかなりあり、一旦減感作療法を開始した後、ロットを変えるとアナフィラキシーを起こすことが稀にある。また、減感作の治療効果も、減感作療法が開始されて以来余り改善されておらず、減感作療法で著効と診断されるのは約30%の患者である。

【0039】本発明のT細胞のエピトープを含むペプチドのうち、花粉症患者の半分以上のT細胞ラインと反応する各々のペプチドは、これらの各ペプチドを単独もしくはいくつかを混合したペプチドを用いて減感作療法を行った場合には、治療した患者の半分以上で減感作が行える可能性がある。また、使用するペプチドは、化学的に合成されたペプチドであるため、アナフィラキシーのような副作用を生じる可能性は低くなると考えられる。例えば、図5は、18名の花粉症患者から樹立されたT細胞ラインがそれぞれ認識するオーバーラップペプチドを、重要度指数「平均刺激係数」(「オーバーラップペプチド刺激によるT細胞ラインの ^3H チミジン取込み量(cpm)」を「抗原を添加しない場合の ^3H チミジン取込み量(cpm)」で割った値の平均値)と「出現頻度(%)」(「試験した全T細胞ライン」に対する「被験ペプチドをT細胞エピトープとして認識したT細胞ライン」の割合(%))とを乗じた値で示したものであるが、図中の番号14、17、29、38、48、68、70および71のペプチドは平均刺激係数が約3.9以上である上、重要度指数が200を超えており、減感作治療に特に有効であると考えられる。

【0040】なお、本発明者が明らかにし、図5に示された少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドの中には、後述のB細胞エピトープを含むことが判明した2種類のペプチドと共通部分を有するペプチドは含まれていない。従って本発明のペプチドは、B細胞エピ

12

トープを刺激しないと考えられるので、減感作剤として実用化可能であると考えられる。

【0041】また、本発明のT細胞のエピトープを含むペプチドを経口投与して、経口免疫寛容を行うことも可能と考えられる。経口免疫寛容(経口減感作)は現在開発中の治療法であるが、効果を示す結果が報告され始めている。例えば、Myelin Basic ProteinのT細胞エピトープ(ペプチド配列21-40、71-90)をマウスに経口投与すると「Experimental Autoimmune Encephalomyelitis(略してEAE)発症」を抑制したことが報告されている[上野川修一、久恒辰博、八村敏志、経口免疫寛容の分子生物学、蛋白質核酸酵素、39、2090-2101(記載頁2098右、9-24行)1994年]。これらの例から、スギ花粉症においても、同定したT細胞エピトープペプチドをそのまま経口投与するか、あるいは胃で消化されないように何らかのカプセルに封入する等の工夫を行って経口投与すれば、免疫寛容状態になる可能性がある。スギ花粉飛散時期の前、具体的には12~1月期に経口的にエピトープペプチドを投与し、免疫寛容状態を誘導しておく。この状態だとスギ花粉が飛散して鼻粘膜に花粉が付着しても、症状が出ないか、あるいは症状が軽くなることが期待される。

【0042】さらにまた、本発明のT細胞のエピトープを含むペプチドに、アミノ酸置換、欠失あるいは付加などの修飾を加えたアナログペプチドを合成し、HLAクラスII分子には結合するが、T細胞には情報が伝わらないアナログペプチドを同定する。これらのペプチドは、例えば点鼻薬として患者に使用すれば、天然のT細胞エピトープを競合的に阻害するので、発症予防が期待される。

【0043】なお、本発明でいうエピトープには、B細胞エピトープも含まれる。B細胞エピトープの同定は、オーバーラップペプチドと患者血清IgE抗体との反応性の測定、オーバーラップペプチドによる患者血清と抗原との結合の阻害の検出等の公知の方法によって行うことができる(特開平6-69336号参照)。既に、1価のB細胞エピトープは、アレルギー反応の抑制に有用であることが知られている。これは、1価のB細胞エピトープは、肥満細胞または好塩基球上の対応するIgE分子と結合し、多価エピトープによるIgE分子架橋の形成を阻害することによるものと考えられている。本発明者らは、本発明のCry j IIの全アミノ酸配列をカバーするオーバーラップペプチドを合成し、これらのペプチドとスギ花粉症患者血清IgE抗体との反応を酵素抗体法で測定した結果、ペプチド「Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile Cys(アミノ酸配列113~123)」および「Cys Thr Ser Ala Ser Ala Cys Gln Asn(アミノ酸配列293~301)」はB細胞エピトープを含んでいることを明らかにした。このようなCry j IIのB細胞エピトープを含むペプチドは、スギ花粉症の診断、予防及び治療

13

に有用である。

【0044】

【実施例】以下本発明を実施例に基づいて詳細に説明するが、本発明はこれに限定されない。

【0045】＜スギ花粉の採取＞スギ花粉は静岡県及び神奈川県内で2月に伐採されたスギの枝に着花した雄花から採取した。Cryj II 抗原性精製用のスギ花粉は-70℃で保存し、RNA調製用のスギ花粉は液体窒素中で急速凍結した後、-70℃で保存した。

【0046】＜RNAの抽出＞Breitenederら(Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 87:19-24 1988)の方法を基にして改良を加えることによりスギ花粉からRNAを抽出した。

【0047】凍結保存したスギ花粉1gを氷冷した15mlの抽出緩衝液(100mM LiCl、10mM Na₂EDTA、1%SDS、20% 2-メルカプトエタノール、100mM Tris-HCl、pH 9.0)に懸濁し、さらに、15mlのフェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコール(24:24:1)を添加した。この懸濁液をテフロンホモジェナイザーに移し、テフロンペステルをモーターで最高回転で回しながら、20～30ストロークホモジェナイズした。この後、遠心操作(10,000g、15分)で水層と有機層に分離して水層を得た。水層に同量のフェノール：クロロフォルム：イソアミルアルコールを加え、5分間振蕩の後、遠心分離(10,000g、15分)で水層を得た。同様の操作を2回繰り返して、さらに15mlのクロロフォルム：イソアミルアルコール(24:1)を用いて1回行った。得られた水層に同量の4M LiClを添加して-20℃で一晩放置した。凍結した溶液を室温で溶解し、遠心操作(20,000g、30分)で沈澱を得た。この沈澱を少量の滅菌蒸留水に溶解し、0.3容の3M CH₃COONa、pH 5.2と2.5容のエタノールを加え、-20℃で60分間放置した。遠心操作(10,000g、30分)により回収した沈澱を滅菌蒸留水に再溶解して全RNA分画とした。

【0048】＜スギ花粉mRNAの調製とcDNAの合成＞スギ花粉全RNA1mgを出発材料として同量の結合緩衝液(3M NaCl、1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH 7.4)を添加した後、オリゴdTセルロースを事前にパックしたスパンカラム(CLONETECH Laboratories Inc.社製、CA、USA)に吸着させ、溶出緩衝液(1mM EDTA、10mM Tris-HCl、pH 7.4)で溶出することにより約10μgのmRNAを精製した(CLONETECH Lab. Inc.社添付プロトコールに従った)。続いて、精製mRNA 5μgからcDNA合成システムプラス(Amersham International plc.社製、Buckinghamshare、England)を使用し、添付されているプロトコールに従ってcDNA約4μgを合成した。

【0049】＜オリゴヌクレオチドプローブの合成＞Cryj IIのN末端から10残基のアミノ酸配列を図1Aに示す。このアミノ酸配列から予想されるcDNAの配列は図1Bである。オリゴヌクレオチドプローブ(Oligo CJII)としてその配列に相補的に、また4カ所で2種類の塩基

14

を用いているので、合計16種類の混合物として合成した(図1C)。混合物として種類を減らすためにG:T塩基対を許容している。

【0050】＜Cryj II cDNAのクローニング＞cDNAライブラリーの作製はcDNAクローニングシステムλgt10(Amersham International plc.社製、Buckinghamshare、England)を使用し、添付されているプロトコールに従って行った。上述のcDNA 1μgをλgt10に組み込みcDNAライブラリーを作製した。約50万のライブラリーのうち約5,000のクローンを直径150mmのプレート1枚にまいた。スクリーニングのためのプローブは上記のオリゴヌクレオチド(Oligo CJII)をT4 polynucleotide kinaseにより[γ-³²P]ATP (7,000Ci/mmol ICN Biochemicals, Inc.社製)で標識して用いた。ファージDNAを固定化したニトロセルロースフィルターを5×SSPE(1×SSPE:0.18M NaCl、10mMリン酸ナトリウム、1mM EDTA)、5×FBP(1×FBP:0.02% Ficoll、0.02%牛血清アルブミン、0.02% ポリビニルピロリドン)、0.3%SDS、100 μg/ml tRNAを含む溶液に48℃1時間以上浸すことによりプレハイブリダイズした。この後ニトロセルロースフィルターを新たに調製した同溶液に浸し、³²Pラベルしたプローブ(Oligo CJII)を加えて48℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った。この後フィルターを6×SSC(1×SSC:0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム)と0.1%SDSを含む溶液で室温30℃、48℃5分洗浄した後、オートラジオグラフィーを行った。4個の強いシグナルが検出され、そのうちの1つのファージDNAを抽出し、制限酵素EcoRIで切断したところ約1.7KbpのDNA断片が挿入されていることが判明した。挿入断片をpUC18にサブクローニングし、キョーシークエンスデレーションキット(宝酒造社製)を用いてデレーションミュータントを作製し全塩基配列の決定に用いた。塩基配列は合成プライマーと色素標識ジデオキシターミネーターを用いてプライマー伸長反応を行い、自動シークエンサー(モデル370A、Applied Biosystems、Japan)で判読することにより決定した。決定されたcDNA全塩基配列を配列番号5に示す。また、オープンリーディングフレームのみの塩基配列を配列番号3に(該塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号1に)、成熟Cryj IIをコードする塩基配列を配列番号4に(該塩基配列がコードするアミノ酸配列を配列番号2に)を示す。

【0051】＜組換えCryj IIの大腸菌での発現＞Promega社より市販されている大腸菌発現ベクターpGEMEX-1はT7プロモーター、T7 gene10のコーディングシークエンスおよびT7ターミネーターをもち、オープンリーディングフレームをT7 gene10の下流のマルチクローニングサイトに挿入してT7 RNAポリメラーゼを発現する大腸菌(例BL21(DE3))に導入することにより高発現を行うベクターである。Cryj II cDNAをBamHI(cDNAの両端に連結したアダプターはBamHIサイトを含む)で消化して

cDNAフラグメントを切り出しpGEMEX-1のBamHI サイトに組み込みCry j IIの発現ベクターpEXCIIを構築した。pEXCIIはT7 gene10 発現産物 (23kD) とCry j II蛋白質 (50kD) との融合蛋白質 (T7 Cry j II、73kD) を発現し得る。pEXCIIを大腸菌BL21(DE3) に導入した形質転換体を培養しIPTGでT7 RNAポリメラーゼを誘導してCry j IIの発現を行った。発現した大腸菌の細胞抽出液をSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。pEXCIIを保持するBL21(DE3) には、約73kDのT7 Cry j II と思われるバンドが見られた。しかし、対照のpGEMEX-1を保持するBL21(DE3) または親株BL21(DE3) には、これらのバンドは見られなかった。

【0052】<Cry j IIとT7 gene10 との融合タンパク質 (T7Cry j II) のスギ花粉症患者血清との反応性>T7 Cry j II を発現した大腸菌の抽出液を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、Millipore 社製PVDF膜にウェスタンブロッティング (Western Blotting) し、スギ花粉症患者5人、健康人3人の血清との反応性を検討した。対照としてpGEMEX-1を保持するBL21およびT7 gene10 とCry j I との融合蛋白質 (T7Cry j I) を発現したBL21の抽出液、スギ花粉より精製した天然型Cry j I を同時にプロットして反応を調べた。図2に示すように、2人の患者血清がT7 Cry j II と反応した。2人の患者血清ともT7 Cry j II、天然型Cry j Iには反応しているがpGEMEX-1を保持するBL21抽出液およびT7 Cry j Iには反応していない。これらの結果からT7Cry j IIはスギ花粉症患者血清中のIgE と反応する抗原性を持っていることが確認された。

【0053】<オーバーラップペプチドの合成>オーバーラップペプチドの合成は、Peptide Synthesizer PSSM-8 (島津製作所製) を用いて行なった。配列番号2に示すCry j IIの一次構造を基にして、N末端側55番目のAla から始まり、C末端のPro まで、10残基のオーバーラップ部分を含む15量体のオーバーラップペプチド90種類を合成した。図3~6にアミノ酸の1文字コードを用いて、合成した全てのオーバーラップペプチドを示す。

【0054】<B細胞株の樹立>Ficoll-Paque比重遠心法で得た末梢血リンパ球 (1×10^6) を、約 1×10^6 PFU (plaque forming units) のEpstein-Barr virus (EBV) と共に37°Cで1時間インキュベートし、ウイルスを細胞に感染させた。このウイルス感染細胞を24ウェル培養プレートに移し、100ng/mlのサイクロスポリンAの存在下で2週間前後培養すると、B細胞コロニーが出現してくる。この時点で半分に分け、新しいウェルに植え継いだ。順次この操作を繰り返して継代培養を行っていくと、自己増殖可能なB細胞が出現してくる場合がある。この自己増殖B細胞を含むウェルの細胞をイクスパンド (expand) し、増殖を確認した後、25cm² 培養フラスコに移して更に30~50日間培養を行い、EBVによってトランスフォームされた (EBV-transformed) B細胞株を得

た。B細胞株の一部は凍結保存した。

【0055】<Cry j II抗原特異的T細胞ラインの樹立>スギ花粉症患者18名末梢血からリンパ球を通常用いられているFicoll-paque比重遠心法で単離し、使用するまで液体窒素中に保存した。スギ花粉症患者の末梢血リンパ球 (4×10^6 個) を、2 mlの自己の血漿20% を添加したRPMI-1640 に懸濁し、10μg/mlの大腸菌で発現させ精製した組換えCry j II抗原と共に24穴培養プレート上で7-8日間培養した。Cry j II抗原刺激を受けて活性化された (幼弱化反応、blastogenesis) T細胞が顕微鏡下で確認できた時点で5 Unit/ml のIL-2を添加し、一晚培養した。翌日からは、20 Unit/ml IL-2、20% ヒトAB型血清 (市販品) を添加したRPMI-1640 で毎日培養液を代えながら、9日間培養した。この時点で、Cry j II抗原を特異的に認識する増殖したT細胞ラインの一部を凍結保存した。さらにT細胞ラインを上記培養液中で4日間培養し、エピトープの同定用の細胞とした。

【0056】<T細胞エピトープを含むオーバーラップペプチドの同定>18名の花粉症患者から樹立したT細胞ラインについてそれぞれスギ花粉アレルゲンオーバーラップペプチドとともに培養し、Cry j II抗原特異的T細胞エピトープを含むペプチドの同定を行った。

【0057】T細胞ラインと同一の患者から樹立した培養B細胞株を50μg/mlのマイトマイシンCで30分間処理し、細胞をRPMI-1640で4回洗浄した。このB細胞を96穴平底プレート (96-well flat-bottomed plate) に播種 (5×10^4 /well) した後、Cry j II (25μg/ml最終濃度) あるいは各オーバーラップペプチド (最終濃度0.5 μM) を各々のウェルに添加し、約60~90分間培養した。T細胞ライン (2×10^4 /well) を各ウェルに播種し、48時間培養の後、0.5 μl/Ci [³H]チミジンをウェルに添加し、さらに16時間培養した。細胞を細胞ハーベスターを用いてガラスフィルター上に捕集し、乾燥してから、細胞内に取込まれた [³H]チミジンのカウント (cpm) を液体シンチレーションカウンターで測定した。

【0058】測定はtriplicate cultureで行い、結果は、オーバーラップペプチド刺激によるT細胞ラインの [³H]チミジン取込み量 (cpm) を、抗原を添加しない場合 (コントロール) の [³H]チミジン取込み量 (cpm) で割った値である刺激係数 (stimulation index; SI) で算出し、SIが2以上の値を示したオーバーラップペプチドを、T細胞エピトープを含むオーバーラップペプチドと同定した。図7及び図8は、18名の花粉症患者からそれぞれ樹立されたCry j II抗原特異的T細胞ラインの少なくとも1種類が認識する少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドを示す。また、図9は、全てのオーバーラップペプチドの「平均刺激係数」(複数の実験によって得られた刺激係数の平均値)「出現頻度(%)」「重要度指数」を示している。

17

【0059】

【発明の効果】本発明のCry j IIの少なくとも一つのエピトープを含むペプチド、T細胞エピトープを含むペプチドは、スギ花粉症の診断、予防及び治療に有用である。

【0060】さらにまた、HLA クラス 分子には結合するが、T細胞には情報が伝わらないようなアナログペプチドを合成し、これらのペプチドを競争阻害によるスギ*

配列：

Met Ala Met Lys Leu Ile Ala Pro Met Ala Phe Leu Ala Met Gln Leu
5 10 15
Ile Ile Met Ala Ala Ala Glu Asp Gln Ser Ala Gln Ile Met Leu Asp
20 25 30
Ser Val Val Glu Lys Tyr Leu Arg Ser Asn Arg Ser Leu Arg Lys Val
35 40 45
Glu His Ser Arg His Asp Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr
50 55 60
Gly Ala Val Gly Asp Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr
65 70 75 80
Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro
85 90 95
Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys
100 105 110
Gln Pro His Phe Thr Phe Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln
115 120 125
Asn Pro Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys
130 135 140
Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly
145 150 155 160
Lys Gln Trp Trp Ala Gly Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile
165 170 175
Cys Asn Asp Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr
180 185 190
Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His
195 200 205
Leu Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile
210 215 220
Thr Ala Pro Arg Asp Ser Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala
225 230 235 240
Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp
245 250 255
Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu
260 265 270
Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu
275 280 285
Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe
290 295 300
Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser
305 310 315 320
Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser

18

*花粉症発症予防に用いることも可能である。

【0061】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：514

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

19 20

325 330 335

Glu Asn Pro Ile Leu Ile Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala

340 345 350

Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys

355 360 365

Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys

370 375 380

Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu

385 390 395 400

Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn

405 410 415

Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro

420 425 430

Ser Ala Lys Arg Lys Glu Ser Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val

435 440 445

Met Val Glu Asn Met Arg Ala Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile

450 455 460

Leu Leu Gly Ser Arg Pro Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys

465 470 475 480

Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln

485 490 495

Glu Tyr Tyr Pro Gln Arg Trp Ile Cys Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr

500 505 510

His Pro

配列番号: 2

配列の長さ: 460

配列の型: アミノ酸

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

*

配列:

Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly Asp Gly

5 10 15

Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala Ala Cys

20 25 30

Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser Lys Lys Phe Val

35 40 45

Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys Gln Pro His Phe Thr Phe

50 55 60

Lys Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu

85 90 95

Met Gly Lys Gly Val Ile Asp Gly Gln Gly Lys Gln Trp Trp Ala Gly

100 105 110

Gln Cys Lys Trp Val Asn Gly Arg Glu Ile Cys Asn Asp Arg Asp Arg

115 120 125

Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ile Gln Gly

130 135 140

Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu Val Phe Gly Asn Cys

145 150 155 160

Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile Thr Ala Pro Arg Asp Ser

165 170 175

21 22
 Pro Asn Thr Asp Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu
 180 185 190
 Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly Asp Asp Cys Val Ala Ile Gly Thr
 195 200 205
 Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu Ile Cys Gly Pro Gly His
 210 215 220
 Gly Ile Ser Ile Gly Ser Leu Gly Arg Glu Asn Ser Arg Ala Glu Val
 225 230 235 240
 Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln Asn Gly
 245 250 255
 Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser His Ile
 260 265 270
 Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile Asn Ser Glu Asn Pro Ile Leu Ile
 275 280 285
 Asn Gln Phe Tyr Cys Thr Ser Ala Ser Ala Cys Gln Asn Gln Arg Ser
 290 295 300
 Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly Thr Ser
 305 310 315 320
 Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met Pro Cys
 325 330 335
 Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys
 340 345 350
 Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His
 355 360 365
 Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro Ser Ala Lys Arg Lys Glu
 370 375 380
 Ser Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val Met Val Glu Asn Met Arg
 385 390 395 400
 Ala Tyr Asp Lys Gly Asn Arg Thr Arg Ile Leu Leu Gly Ser Arg Pro
 405 410 415
 Pro Asn Cys Thr Asn Lys Cys His Gly Cys Ser Pro Cys Lys Ala Lys
 420 425 430
 Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln Glu Tyr Tyr Pro Gln Arg
 435 440 445
 Trp Ile Cys Ser Cys His Gly Lys Ile Tyr His Pro
 450 455 460

配列番号: 3

配列の長さ: 1542

配列の型: 核酸

* トポロジ: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

*

配列:

ATGGCCATGA AATTAATTGC TCCAATGGCC TTTCTGGCCA TGCAATTGAT TATAATGGCG 60
 GCAGCAGAAG ATCAATCTGC CCAATTATG TTGGACAGTG TTGTCGAAAA ATATCTTAGA 120
 TCGAATCGGA GTTAAAGAAA AGTTGAGCAT TCTCGTCATG ATGCTATCAA CATCTTCAAT 180
 GTGGAAAAAT ATGGCGCAGT AGGCGATGGA AAGCATGATT GCACTGAGGC ATTTTCAACA 240
 GCATGGCAAG CTGCATGCAA AAACCCATCA GCAATGTTGC TTGTGCCAGG CAGCAAGAAA 300
 TTTGTTGTAA ACAATTTGTT CTTCAATGGG CCATGTCAAC CTCACTTTAC TTTTAAGGTA 360
 GATGGGATAA TAGCTGCGTA CCAAAATCCA GCGAGCTGGA AGAATAATAG AATATGGTTG 420
 CAGTTTGCTA AACTTACAGG TTTTACTCTA ATGGGTAAAG GTGTAATTGA TGGGCAAGGA 480
 AAACAATGGT GGGCTGGCCA ATGTAAATGG GTCAATGGAC GAGAAATTTG CAACGATCGT 540
 GATAGACCAA CAGCCATTAA ATTCGATTTT TCCACGGGTC TGATAATCCA AGGACTGAAA 600

23

24

CTAATGAACA GTCCCGAATT TCATTTAGTT TTTGGGAATT GTGAGGGAGT AAAAATCATC 660
 GGCATTAGTA TTACGGCACC GAGAGACAGT CCTAACACTG ATGGAATTGA TATCTTTGCA 720
 TCTAAAACT TTCATTACA AAAGAACACG ATAGGAACAG GGGATGACTG CGTCGCTATA 780
 GGCACAGGGT CTTCTAATAT TGTGATTGAG GATCTGATTT GCGGTCCAGG CCATGGAATA 840
 AGTATAGGAA GTCTTGGGAG GGAAACTCT AGAGCAGAGG TTTCATACGT GCACGTAAT 900
 GGGGCTAAAT TCATAGACAC ACAAATGGA TTAAGAATCA AAACATGGCA GGGTGGTTCA 960
 GGCATGGCAA GCCATATAAT TTATGAGAAT GTTGAAATGA TAAATTCGGA GAACCCCAT 1020
 TTAATAAATC AATTCTACTG CACTTCGGCT TCTGCTTGCC AAAACCAGAG GTCTGCGGTT 1080
 CAAATCCAAG ATGTGACATA CAAGAACATA CGTGGGACAT CAGCAACAGC AGCAGCAATT 1140
 CAACCTAAGT GTAGTGACAG TATGCCCTGC AAAGATATAA AGCTAAGTGA TATATCTTTG 1200
 AAGCTTACCT CAGGGAAAAT TGCTTCCTGC CTTAATGATA ATGCAAATGG ATATTTCACT 1260
 GGACACGTCA TCCCTGCATG CAAGAATTTA AGTCCAAGT CTAAGCGAAA AGAATCTAAA 1320
 TCCCATAAAC ACCCAAAAC TGTAATGGTT GAAAATATGC GAGCATATGA CAAGGGTAAC 1380
 AGAACACGCA TATTGTTGGG GTCGAGGCT CCGAATTGTA CAAACAAATG TCATGGTTGC 1440
 AGTCCATGTA AGGCCAAGTT AGTTATTGTT CATCGTATTA TGCCGCAGGA GTATTATCCT 1500
 CAGAGGTGGA TATGCAGCTG TCATGGCAA ATCTACCATC CA 1542

配列番号: 4

配列の長さ: 1380

配列の型: 核酸

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

*

配列:

GCTATCAACA TCTTCAATGT GGAAAAATAT GGCGCAGTAG GCGATGAAA GCATGATTGC 60
 ACTGAGGCAT TTTCAACAGC ATGGCAAGCT GCATGCAAAA ACCCATCAGC AATGTTGCTT 120
 GTGCCAGGCA GCAAGAAATT TGTGTAAAC AATTGTTCT TCAATGGGCC ATGTCAACCT 180
 CACTTTACTT TTAAGGTAGA TGGGATAATA GCTGCGTACC AAAATCCAGC GAGCTGGAAG 240
 AATAATAGAA TATGGTTGCA GTTTGCTAAA CTTACAGGTT TTAATCTAAT GGGTAAAGGT 300
 GTAATTGATG GGCAAGGAAA ACAATGGTGG GCTGGCCAAT GTAAATGGGT CAATGGACGA 360
 GAAATTGCA ACGATCGTGA TAGACCAACA GCCATTAAAT TCGATTTTTC CACGGGTCTG 420
 ATAATCCAAG GACTGAACT AATGAACAGT CCCGAATTTC ATTTAGTTTT TGGGAATTGT 480
 GAGGGAGTAA AAATCATCGG CATTAGTATT ACGGCACCGA GAGACAGTCC TAACACTGAT 540
 GGAATTGATA TCTTGCATC TAAAACTTT CACTTACAAA AGAACACGAT AGGAACAGGG 600
 GATGACTGCG TCGCTATAGG CACAGGGTCT TCTAATATTG TGATTGAGGA TCTGATTGTC 660
 GGTCCAGGCC ATGGAATAAG TATAGGAAGT CTTGGGAGGG AAAACTCTAG AGCAGAGGTT 720
 TCATACGTGC ACGTAAATGG GGCTAAATTC ATAGACACAC AAAATGGATT AAGAATCAAA 780
 ACATGGCAGG GTGGTTCAGG CATGGCAAGC CATATAATTT ATGAGAATGT TGAAATGATA 840
 AATTGGGAGA ACCCATATT AATAAATCAA TTCTACTGCA CTTGGGCTTC TGCTTGCCAA 900
 AACCAGAGGT CTGGGTTCA AATCCAAGAT GTGACATACA AGAACATACG TGGGACATCA 960
 GCAACAGCAG CAGCAATTCA ACTTAAGTGT AGTGACAGTA TGCCCTGCAA AGATATAAAG 1020
 CTAAGTGATA TATCTTTGAA GCTTACCTCA GGGAAAATTG CTTCTGCCT TAATGATAAT 1080
 GCAAATGGAT ATTTCACTGG ACACGTCATC CTTGCATGCA AGAATTTAAG TCCAAGTGCT 1140
 AAGCGAAAAG AATCTAAATC CCATAAACAC CCAAAACTG TAATGGTTGA AAATATGCGA 1200
 GCATATGACA AGGGTAACAG AACACGCATA TTGTTGGGGT OGAGGCCTCC GAATTGTACA 1260
 AACAAATGTC ATGGTTGCAG TCCATGTAAG GCCAAGTTAG TTATTGTTCA TCGTATTATG 1320
 CCGCAGGAGT ATTATCCTCA GAGGTGGATA TGCAGCTGTC ATGGCAAAAT CTACCATCCA 1380

配列番号: 5

配列の長さ: 1733

配列の型: 核酸

* トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

※

配列:

AGTTGAGTTC GAGACAAGTA TAGAAAGAAT TTTCTTTTAT TAAAATGGCC ATGAAATTAA 60
 TTGCTCCAAT GGCCTTTCTG GCCATGCAAT TGATTATAAT GGCGGCAGCA GAAGATCAAT 120
 CTGCCCAAAT TATGTTGGAC AGTGTGTCG AAAAATATCT TAGATCGAAT CGGAGTTTAA 180

25

26

GAAAAGTTGA GCATTCTCGT CATGATGCTA TCAACATCTT CAATGTGGAA AAATATGGCG 240
 CAGTAGGCGA TGGAAAGCAT GATTGCACTG AGGCATTTTC AACAGCATGG CAAGCTGCAT 300
 GCAAAAACCC ATCAGCAATG TTGCTTGTC CAGGCAGCAA GAAATTTGTT GTAAACAATT 360
 TGTCTTCAA TGGGCCATGT CAACCTCACT TTAATTTTAA GGTAGATGGG ATAATAGCTG 420
 CGTACCAAAA TCCAGCGAGC TGGAGAATA ATAGAATATG GTTGCACTTT GCTAAACTTA 480
 CAGGTTTTAC TCTAATGGGT AAAGGTGTAA TTGATGGGCA AGGAAAACAA TGGTGGGCTG 540
 GCCAATGTAA ATGGGTCAAT GGACGAGAAA TTTGCAACGA TCGTGATAGA CCAACAGCCA 600
 TTAAATTCGA TTTTCCACG GGTCTGATAA TCCAAGGACT GAAACTAATG AACAGTCCCG 660
 AATTTCAATT AGTTTGTGGG AATTGTGAGG GAGTAAAAAT CATCGGCATT AGTATTACGG 720
 CACCGAGAGA CAGTCCTAAC ACTGATGGAA TTGATATCTT TGCATCTAAA AACTTTCCT 780
 TACAAAAGAA CACGATAGGA ACAGGGGATG ACTGCGTCGC TATAGGCACA GGTCTTCTA 840
 ATATTGTGAT TGAGGATCTG ATTTGCGGTC CAGGCCATGG AATAAGTATA GGAAGTCTTG 900
 GGAGGGAAAA CTCTAGAGCA GAGGTTTCAT ACGTGCACGT AAATGGGCT AAATTCATAG 960
 ACACACAAAA TGGATTAAGA ATCAAAACAT GGCAGGGTGG TTCAGGCATG GCAAGCCATA 1020
 TAATTTATGA GAATGTTGAA ATGATAAATT CGGAGAACCC CATATTAATA AATCAATTCT 1080
 ACTGCACTTC GGCTTCTGCT TGCCAAAACC AGAGGTCTGC GGTTCAAATC CAAGATGTGA 1140
 CATACAAGAA CATACGTGGG ACATCAGCAA CAGCAGCAGC AATTCAACTT AAGTGTAGTG 1200
 ACAGTATGCC CTGCAAGAT ATAAAGCTAA GTGATATATC TTTGAAGCTT ACCTCAGGGA 1260
 AAATTGCTTC CTGCCTTAAT GATAATGCAA ATGGATATTT CAGTGGACAC GTCATCCCTG 1320
 CATGCAAGAA TTTAAGTCCA AGTGCTAAGC GAAAAGAATC TAAATCCCAT AAACACCCAA 1380
 AAAGTGAAT GGTGAAAAT ATGCGAGCAT ATGACAAGGG TAACAGAACA CGCATATTGT 1440
 TGGGGTCGAG GCCTCCGAAT TGTACAAACA AATGTCATGG TTGCAGTCCA TGTAAGGCCA 1500
 AGTTAGTTAT TGTTCATCGT ATTATGCGC AGGAGTATTA TCCTCAGAGG TGGATATGCA 1560
 GCTGTCATGG CAAAATCTAC CATCCATAAT GAGATACATT GAAACTGTAT GTGCTAGTGA 1620
 ATATTCTTGT GGTACAATAT TAGAACTGAT ATTGAAAATA AATCATCAAT GTTTCTAAGG 1680
 CATTATAAT AGATTATATT AATGGTTCAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA 1733

【図面の簡単な説明】

【図1】スギ花粉アレルゲンCry j IIのN末端から10残基のアミノ酸配列(A)。スギ花粉アレルゲンCry j IIのN末端から10残基のアミノ酸配列から予想されるDNA配列(B)。スギ花粉アレルゲンCry j IIをコードするcDNAをスクリーニングするためのプローブのDNA配列(C)。

【図2】T7 Cry j IIの抗原性を、2名のスギ花粉症患者の血清を用いて、ウェスタンブロット法により同定した結果を示す。レーン1はpMGEMEX-1（陰性対照）を保持するBL21(DE3)、レーン2はT7 Cry j Iを発現したBL21(DE3)、レーン3はT7Cry j IIを発現したBL21(DE3)、レーン4はスギ花粉より精製したCry j Iをそれぞれ示す。A、Bは血清の由来する患者が異なるのみで、他は同じである。

【図3】Cry j IIの全アミノ酸配列をカバーするオーバー

*オーバーラップペプチドを示す。

【図4】Cry j IIの全アミノ酸配列をカバーするオーバーラップペプチドを示す。

【図5】Cry j IIの全アミノ酸配列をカバーするオーバーラップペプチドを示す。

【図6】Cry j IIの全アミノ酸配列をカバーするオーバーラップペプチドを示す。

【図7】Cry j IIの少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドを示す。

【図8】Cry j IIの少なくとも一つのT細胞エピトープを含むペプチドを示す。

【図9】18名のスギ花粉症患者から樹立されたCry j IIアレルゲンに特異的なT細胞ラインがそれぞれ認識する

40 オーバーラップペプチドの重要度指数を示す。

【図6】

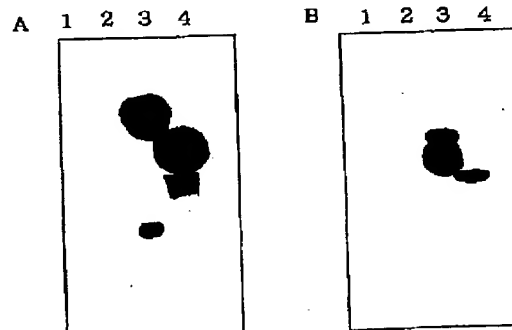
86. (426-440) C S P C K A K L V I V H R I M
 87. (431-445) A K L V I V H R I M P Q E Y Y
 88. (436-450) V H R I M P Q E Y Y P Q R N I
 89. (441-455) P Q E Y Y P Q R N I C S C H G
 90. (446-460) P Q R N I C S C H G K I Y H P

【図1】

(A) アミノ酸配列 Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr

(B) 予想されるcDNA配列 5' GCT ATT AAT ATT TTT AAT GTT GAA AAA TAT
 5' GCC ATC AAC ATC TTC AAC GTC GAG AAG TAC
 5' GCA ATA AAT ATA TTT AAT GTA GAA AAA TAT
 5' GCG ATT AAT ATT TTT AAT GTC GAA AAA TAT
 (C) 合成したプローブ 3' CGG TAG TTG TAG AAG TTG CAG CTT TTT ATG
 3' CGT TAT TTG TAT AAG TTG CAC CTT TTT ATG

【図2】



【図3】

1. (1-15) A I N I F N V E K Y G A V G D
 2. (6-20) N V E K Y G A V G D G K H D C
 3. (11-25) G A V G D G K H D C T E A F S
 4. (16-30) G K H D C T E A F S T A W Q A
 5. (21-35) T E A F S T A W Q A A C K N P
 6. (28-40) T A W Q A A C K N P S A M L L
 7. (31-45) A C K N P S A M L L V P G S K
 8. (36-50) S A M L L V P G S K R F V V N
 9. (41-55) V P G S K R F V V N N L F F N
 10. (46-60) K F V V N N L F F N G P C Q P
 11. (51-65) N L F F N G P C Q P H F T F K
 12. (56-70) G P C Q P H F T F K V D G I I
 13. (61-75) H F T F K V D G I I A A Y Q N
 14. (66-80) V D G I I A A Y Q N P A S W K
 15. (71-85) A A Y Q N P A S W K N N R I W
 16. (76-90) P A S W K N N R I W L Q F A K
 17. (81-95) N N R I W L Q F A K L T G F T
 18. (86-100) L Q F A K L T G F T L M G K G
 19. (91-105) L T G F T L M G K G V I D G Q
 20. (96-110) L M G K G V I D G Q G K Q W W
 21. (101-115) V I D G Q G K Q W W A G Q C K
 22. (106-120) G K Q W W A G Q C K W V N G R
 23. (111-125) A G Q C K W V N G R E I C N D
 24. (116-130) W V N G R E I C N D R D R P T
 25. (121-135) E I C N D R D R P T A I K F D
 26. (126-140) R D R P T A I K F D F S T G L
 27. (131-145) A I K F D F S T G L I I Q G L

1. pGEMEX-1を保持するBL-21
 2. T7-Cryj1を発現したBL-21
 3. T7-Cryj1を発現したBL-21
 4. スギ花粉より精製したCryj1

【図4】

28. (136-150) F S T G L I I Q G L K L M N S
 29. (141-155) I I Q G L K L M N S P E P H L
 30. (146-160) K L M N S P E P H L V F G N C
 31. (151-165) P E P H L V F O N C E G V K I
 32. (156-170) V F G N C E G V K I I G I S I
 33. (161-175) E G V K I I G I S I T A P R D
 34. (166-180) I G I S I T A P R D S P N T D
 35. (171-185) T A P R D S P N T D G I D I F
 36. (176-190) S P N T D G I D I F A S K N F
 37. (181-195) G I D I F A S K N F H L Q K N
 38. (186-200) A S K N F H L Q K N T I G T G
 39. (191-205) H L Q K N T I G T G D D C V A
 40. (196-210) T I G T G D D C V A I G T G S
 41. (201-215) D D C V A I G T G S S N I V I
 42. (206-220) I G T G S S N I V I E D L I C
 43. (211-225) S N I V I E D L I C G P G H G
 44. (216-230) E D L I C G P G H G I S I G S
 45. (221-235) G P G H G I S I G S L G R E N
 46. (226-240) I S I G S L G R E N S R A E V
 47. (231-245) L G R E N S R A E V S Y V H V
 48. (236-250) S R A E V S Y V H V N G A K F
 49. (241-255) S Y V H V N G A K F I D T Q N
 50. (246-260) N G A K F I D T Q N G L R I K
 51. (251-265) I D T Q N G L R I K T W Q G G
 52. (256-270) G L R I K T W Q G G S G M A S
 53. (261-275) T W Q G G S G M A S H I I Y E
 54. (266-280) S G M A S H I I Y E N V E M I
 55. (271-285) H I I Y E N V E M I N S E N P
 56. (276-290) N V E M I N S E N P I L I N Q

【図5】

57. (281-295) N S E N P I L I N Q F Y C T S
 58. (286-300) I L I N Q F Y C T S A S A C Q
 59. (291-305) F Y C T S A S A C Q N Q R S A
 60. (296-310) A S A C Q N Q R S A V Q I Q D
 61. (301-315) N Q R S A V Q I Q D V T Y K N
 62. (308-320) V Q I Q D V T Y K N I R G T S
 63. (311-325) V T Y K N I R G T S A T A A A
 64. (316-330) I R G T S A T A A A I Q L K C
 65. (321-335) A T A A A I Q L K C S D S M P
 66. (326-340) I Q L K C S D S M P C K D I K
 67. (331-345) S D S M P C K D I K L S D I S
 68. (336-350) C K D I K L S D I S L K L T S
 69. (341-355) L S D I S L K L T S G K I A S
 70. (346-360) L K L T S G K I A S C L N D N
 71. (351-365) G K I A S C L N D N A N G Y F
 72. (356-370) C L N D N A N G Y F S G H V I
 73. (361-375) A N G Y F S G H V I P A C K N
 74. (366-380) S G H V I P A C K N L S P S A
 75. (371-385) P A C K N L S P S A K R K E S
 76. (376-390) L S P S A K R K E S K S H K H
 77. (381-395) K R K E S K S H K H P K T V M
 78. (386-400) K S H K H P K T V M V E N M R
 79. (391-405) P K T V M V E N M R A Y D K G
 80. (396-410) V E N M R A Y D K G N R T R I
 81. (401-415) A Y D K G N R T R I L L G S R
 82. (406-420) N R T R I L L G S R P P N C T
 83. (411-425) L L G S R P P N C T N K C H G
 84. (416-430) P P N C T N K C H G C S P C K
 85. (421-435) N X C H G C S P C K A K L V I

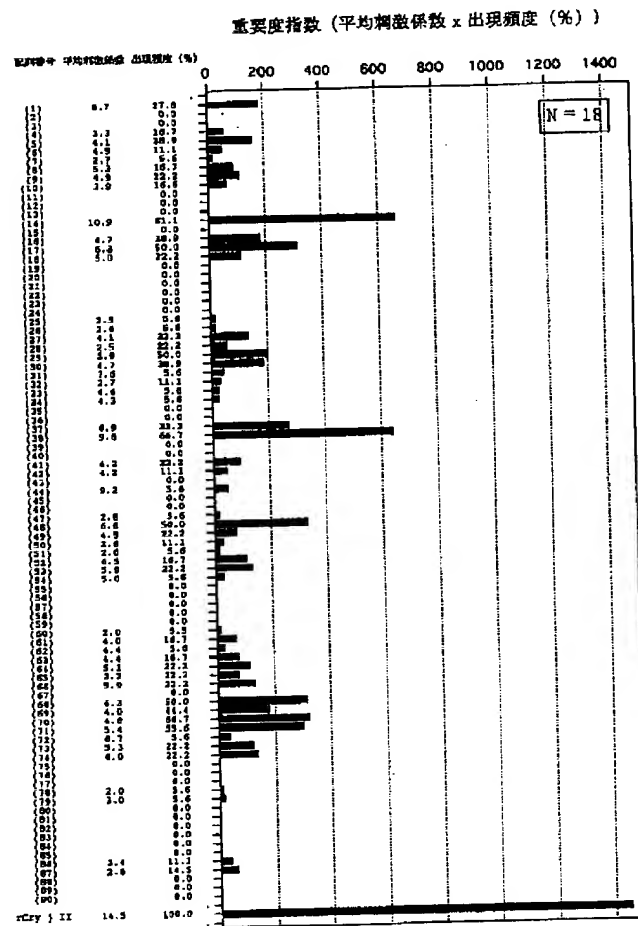
【図7】

1. Ala Ile Asn Ile Phe Asn Val Glu Lys Tyr Gly Ala Val Gly Asp
 4. Gly Lys His Asp Cys Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala
 5. Thr Glu Ala Phe Ser Thr Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro
 6. Thr Ala Trp Gln Ala Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu
 7. Ala Cys Lys Asn Pro Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser Lys
 8. Ser Ala Met Leu Leu Val Pro Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn
 9. Val Pro Gly Ser Lys Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn
 10. Lys Phe Val Val Asn Asn Leu Phe Phe Asn Gly Pro Cys Gln Pro
 14. Val Asp Gly Ile Ile Ala Ala Tyr Gln Asn Pro Ala Ser Trp Lys
 16. Pro Ala Ser Trp Lys Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys
 17. Asn Asn Arg Ile Trp Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr
 18. Leu Gln Phe Ala Lys Leu Thr Gly Phe Thr Leu Met Gly Lys Gly
 26. Arg Asp Arg Pro Thr Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu
 27. Ala Ile Lys Phe Asp Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu
 28. Phe Ser Thr Gly Leu Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser
 29. Ile Ile Gln Gly Leu Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu
 30. Lys Leu Met Asn Ser Pro Glu Phe His Leu Val Phe Gly Asn Cys
 31. Pro Glu Phe His Leu Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile
 32. Val Phe Gly Asn Cys Glu Gly Val Lys Ile Ile Gly Ile Ser Ile
 37. Gly Ile Asp Ile Phe Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn
 38. Ala Ser Lys Asn Phe His Leu Gln Lys Asn Thr Ile Gly Thr Gly
 41. Asp Asp Cys Val Ala Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile
 42. Ile Gly Thr Gly Ser Ser Asn Ile Val Ile Glu Asp Leu Ile Cys
 44. Glu Asp Leu Ile Cys Gly Pro Gly His Gly Ile Ser Ile Gly Ser
 47. Leu Gly Arg Glu Asn Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val
 48. Ser Arg Ala Glu Val Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe
 49. Ser Tyr Val His Val Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln Asn
 50. Asn Gly Ala Lys Phe Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys

【図8】

51. Ile Asp Thr Gln Asn Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly
 52. Gly Leu Arg Ile Lys Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser
 53. Thr Trp Gln Gly Gly Ser Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu
 54. Ser Gly Met Ala Ser His Ile Ile Tyr Glu Asn Val Glu Met Ile
 60. Ala Ser Ala Cys Gln Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp
 61. Asn Gln Arg Ser Ala Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn
 62. Val Gln Ile Gln Asp Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly Thr Ser
 63. Val Thr Tyr Lys Asn Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala
 64. Ile Arg Gly Thr Ser Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys
 85. Ala Thr Ala Ala Ala Ile Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met Pro
 86. Ile Gln Leu Lys Cys Ser Asp Ser Met Pro Cys Lys Asp Ile Lys
 88. Cys Lys Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser
 89. Leu Ser Asp Ile Ser Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser
 70. Leu Lys Leu Thr Ser Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn
 71. Gly Lys Ile Ala Ser Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe
 72. Cys Leu Asn Asp Asn Ala Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile
 73. Ala Asn Gly Tyr Phe Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn
 74. Ser Gly His Val Ile Pro Ala Cys Lys Asn Leu Ser Pro Ser Ala
 78. Lys Ser His Lys His Pro Lys Thr Val Met Val Glu Asn Met Arg
 79. Pro Lys Thr Val Met Val Glu Asn Met Arg Ala Tyr Asp Lys Gly
 86. Cys Ser Pro Cys Lys Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met
 87. Ala Lys Leu Val Ile Val His Arg Ile Met Pro Gln Glu Tyr Tyr

【図9】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶
 C 12 Q 1/68
 G 01 N 33/53

識別記号 庁内整理番号
 A 9453-4B
 Q

F I

技術表示箇所